

①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Off nlegungsschrift**
⑪ **DE 3823451 A1**

②① Aktenzeichen: P 38 23 451.3
②② Anmeldetag: 11. 7. 88
②③ Offenlegungstag: 18. 1. 90

⑤① Int. Cl. 5:
C12N 1/21
C 12 N 15/03
C 12 P 13/08
C 12 P 19/34
// C07H 21/04,
C12P 19/34,13/08

Besondereigenschaften

DE 3823451 A1

⑦① Anmelder:

Kernforschungsanlage Jülich GmbH, 5170 Jülich,
DE; Degussa AG, 6000 Frankfurt, DE

⑦② Erfinder:

Cremer, Josef; Eggeling, Lothar, Dr.; Sahm,
Hermann, Prof., 5170 Jülich, DE

⑤④ Rekombinante DNA, damit transformierte Mikroorganismen und Verfahren zur Herstellung von L-Lysin mit Hilfe dieser Mikroorganismen

Die Erfindung betrifft in *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* replizierbare rekombinante DNA, bestehend aus Vektor-DNA und einem DNA-Fragment, das ein für Aspartatseminaldehyd-Dehydrogenase (*asd*) und/oder Dihydrodipicolinatsynthese (*dapA*) codierendes Gen enthält und aus einem Mikroorganismus der Gattung *Escherichia*, *Serratia* oder *Klebsiella* stammt.

Die mit der rekombinanten DNA transformierten Bakterien produzieren in erhöhtem Maße L-Lysin.

DE 3823451 A1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft in *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* replizierbare rekombinante DNA, damit transformierte Mikroorganismen und ein Verfahren zur Herstellung von L-Lysin mit Hilfe dieser Mikroorganismen.

Die Aminosäuren der Aspartatfamilie, wie Methionin, Threonin, Isoleucin und insbesondere Lysin sind essentiell für Mammalia (Mensch, Schwein) sowie Aves (Geflügel). Aus diesem Grunde wird insbesondere Lysin in der Futtermittelindustrie in großen Mengen benötigt und vornehmlich mit den sogenannten coryneformen Bakterien, zu denen *Corynebacterium*- und *Brevibacterium*-Arten gehören, durch Fermentation produziert. Die für die Produktion benutzten Bakterien sind in ihren Eigenschaften durch klassische ungerichtete Mutagenese verändert, die zu vermehrter Lysinbildung führt. Diese Veränderungen können die Regulation von Enzymen betreffen, oder auch zu gesteigerter Enzymaktivität führen.

Durch die in den letzten Jahren entwickelten Methoden, DNA *in vitro* zu rekombinieren (r-DNA-Technik) und coryneforme Bakterien zu transformieren, ist es möglich geworden, Biosynthesegene des Lysins in diesen Bakterien zu amplifizieren und so durch erhöhte Enzymaktivität eine gesteigerte Lysinproduktion zu erreichen. So wird in der EP-A- 02 19 207 ein Verfahren beschrieben, bei dem aus *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* isoliertes für *asd* oder AAT kodierendes Gen mit Vektor DNA als rekombinante DNA in *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* wieder eingeführt werden soll, um so die Produktion von Lysin mit den transformierten Mikroorganismen zu erhöhen, wobei Steigerungen bis zu 20% erzielt werden konnten.

Gemäß der EP-A- 01 43 195 wird aus einem für PEPC kodierenden Gen aus *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* mit Vektor DNA rekombinante DNA erzeugt, die in *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* eingeschleust wird, um so zu einer gesteigerten Lysin-Bildung zu gelangen.

Gemäß der EP-A- 01 97 335 wird schließlich rekombinante DNA aus *dapA* Gen oder THPS Gen mit Vektor DNA gebildet und in *Corynebacterium* bzw. *Brevibacterium* transformiert. Die Beispiele zeigen allerdings der allgemein üblichen Praxis folgend lediglich die Verwendung von homologer DNA, wobei die für die biosynthetischen Enzyme kodierende DNA aus coryneformen Bakterien stammt und auch in diese über geeignete Vektoren wieder eingeschleust wird.

Es wurde nun gefunden, daß die Expression der Biosynthesegene sowie die Stabilität dieser Gene in den coryneformen Bakterien eine deutliche Verbesserung erfährt, und die Lysinbildung gesteigert werden kann, wenn für die Bildung der rekombinanten DNA von einer nicht-homologen DNA speziell von gram-negativen Bakterien ausgegangen wird, die zur Gattung *Escherichia*, *Serratia* und *Klebsiella* gehören.

Gegenstand der Erfindung ist in *Corynebacterium* oder *Brevibacterium* replizierbare rekombinante DNA, bestehend aus Vektor-DNA und einem DNA-Fragment, das ein für Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase (*asd*) und/oder Dihydrodipicolinatsynthase (*dapA*) codierendes Gen enthält und aus einem Mikroorganismus der Gattung *Escherichia*, *Serratia* oder *Klebsiella* stammt.

Bevorzugt sind Stämme, die L-Lysin produzieren.

Die Gene stammen insbesondere aus Plasmiden, wie

sie bereits beschrieben wurden und allgemein verfügbar waren und sind. Für das *asd*-Gen werden als Herkunft insbesondere gewählt:

die Plasmide *pAD* 1, *pAD* 11 und *PAD* 20, insbesondere *pAD* 20.

Entsprechend werden als Ursprung für das *dapA*-Gen Plasmide wie beispielsweise *pAD* 1, *pAD* 3, *pAD* 5, *pAD* 68, insbesondere aber *pAD* 3, genutzt.

Als Vektor DNA werden Plasmide, Phagen oder Derivate davon benutzt, die aus Bakterien der Gruppe der *Corynebakterien* und *Brevibakterien* stammen, wie z.B. *pZ1*, *pSA* 77, *BL1*, insbesondere *pZ1*.

In *Praxi* erfolgt die Isolierung der chromosomalen DNA aus den genannten Spenderorganismen und die Klonierung der gewünschten für die Biosynthese des Lysins codierenden Gene durch Komplementation geeigneter Mutanten in bekannter Weise (I. Maniatis et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1982). Dabei wird z. B. das klonierte *asd*-Gen des nicht-coryneformen Bakteriums (insbesondere von *E. coli*) aus dem Plasmid *pAD* 20 (C. Haziza et al., EMBO Journal 1 (1982) 379–384) mit dem Restriktionsenzym *Bam*H1 herausgeschnitten und mit dem Vektor *pZ1* (DE-Patentanmeldung 37 37 729.9), der mit dem Restriktionsenzym *Bgl*II verdaut und zusätzlich mit alkalischer Phosphatase behandelt wird, ligiert. Durch die Ligation bildet sich das Fusionsplasmid *pZ1/pAD* 20. Die Vorgehensweise um zu diesem Plasmid zu gelangen ist in Abbildung 1 dargestellt. Das so gewonnene Plasmid enthält das heterologe *asd*-Gen aus *E. coli* und repliziert in *C. glutamicum*.

In ähnlicher Weise kann auch das *dapA*-Gen aus *E. coli* aus dem Plasmid *pDA3* (F. Richaud et al., J. Bacteriology 160 (1986) 297–300) mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Sma*I herausgeschnitten und das erhaltene DNA-Fragment mit dem Vektor *pZ1* ligiert werden, der zuvor mit dem Restriktionsenzym *Pst*I und *Sca*I sowie mit alkalischer Phosphatase behandelt wird.

Die erhaltenen rekombinanten DNA-Moleküle können beispielsweise durch Transformation von Protoplasten nach einem nach Santamaria modifizierten Verfahren in coryneforme Bakterien hineingebracht werden (Santamaria et al., J. Bacteriology 162 (1985) 463–467). Als Recipienten der rekombinanten DNA, die die nicht-homologe DNA für Biosynthesegene des Lysins enthält, werden bevorzugt mutierte Stämme von *C. glutamicum* verwendet, die bereits Lysin ins Kulturmedium ausscheiden. Repräsentative Beispiele solcher Recipienten sind für bestimmte Aminosäuren auxotrophe (Homoserin, Leucin) oder gegen Lysinanaloga resistente (S-2-Aminoethylcystein, Methyllysin, Caprolactam) Stämme von *C. glutamicum* oder *Brevibacterium flavum*. Transformanten, die die heterologe DNA und damit die gewünschten Gene enthalten, können leicht aufgrund der im Vektor *pZ1* lokalisierten Kanamycin-Resistenz selektioniert werden. Das *asd*-Gen sowie das *dapA*-Gen aus *E. coli* wird in Stämmen der Gattung *Corynebacterium* mit hoher Aktivität exprimiert, was durch Enzymmessungen nach dem von Boy und Patte im Journal of Bacteriology 11, (1972) 84–92, bzw. dem von Yugari and Gilvarg (1962) im Journal of Biological Chemistry 240, (1962) 4710–4716 beschriebenen Verfahren nachgewiesen wurde.

Die zu verwendenden Medien zur Inkubation der Transformanten sind synthetische, halbsynthetische oder natürliche Medien, wie sie häufig zur Inkubation von Bakterien verwendet werden. Sie enthalten Nährstoffe, wie Kohlenstoffquellen, Stickstoffquellen und an-

organische Verbindungen. Beispiele günstiger Kohlenstoffquellen sind Zucker, wie Glucose, Fructose, Invertzucker, verzuckerte Stärke, Sorbit oder Glycerin. Beispiele günstiger Stickstoffquellen sind Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumnitrat, Ammoniumphosphat, Ammoniumhydroxid, Ammoniumtartrat, Ammoniumacetat oder Harnstoff. Beispiele günstiger Nährstoffe, die sowohl als Stickstoff, als auch als Kohlenstoffquelle angeboten werden können, sind Pepton Fleischextrakt oder Maisquellwasser.

Beispiele günstiger anorganischer Verbindungen sind Kaliumdihydrogenphosphat, Dikaliumhydrogenphosphat, Natriumhydrogenphosphat, Dinatriumhydrogenphosphat, Magnesiumsulfat, Magnesiumchlorid, Kaliumchlorid, Natriumchlorid, Eisen(II)-sulfat, Eisen(II)-chlorid, Eisen(III)-sulfat, Eisen(III)-chlorid, Mangansulfat, oder Manganchlorid. Beispiele weiterer günstiger Nährstoffe sind Hefeextrakt oder Vitamine.

Zudem weist das Nährmedium bevorzugt eine Biotinkonzentration von mehr als 50 µg/l auf, da sonst das Wachstum suboptimal ist.

Weiterhin setzt man der Fermentationsbrühe vorzugsweise Kanamycin in einer Konzentration von 50 µg/ml zu, um den Selektionsdruck auf die plasmidtragenden Bakterien aufrechtzuerhalten. Die Fermentation wird unter aeroben Bedingungen bei einem pH-Wert von 5–9 und 25–40°C 48 bis 144 Stunden durchgeführt, wobei L-Lysin in der Nährlösung akkumuliert.

Die Isolierung und Reinigung der Aminosäure aus der Nährlösung erfolgt mittels bekannter Methoden.

Erfindungsgemäß eingesetzt als Recipienten der rekombinanten DNA werden bevorzugt Stämme von *C. glutamicum* ATCC 13 032, die bereits Mutationen zur Herstellung von Lysin tragen.

Die verwendeten Stämme DG 52-5 und MH20–22B können leicht aus den Stämmen 52-5/pZ1–9.3 (DSM 4208) und MH20–22B/pZ1–9.3 (DSM 4207) erhalten werden, indem man das erfindungsgemäße Plasmid pZ1 entfernt ohne die Gastgeberzelle zu schädigen.

Methoden für derartige Operationen sind beschrieben in Bact. Review 36, (1972) 361–504 und J. Bacteriol. 88, (1964) 261.

Es zeigt sich, daß die transformierten Stämme über eine verbesserte Fähigkeit verfügen, L-Lysin zu bilden.

Beispiele

Beispiel 1

Subklonierung des *asd*-Gens aus *E. coli* in pZ1

Das *asd*-Gen enthaltende Plasmid pAD 20 wurde aus *E. coli* RM 4102 (Haziza et al. 1982, EMBO Journal, 379–384) isoliert wie in Maniatis et al., (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, beschrieben. 0,1 µg dieses Plasmids wurden mit 1 U des Restriktionsenzym *Bam*H1 (Hersteller Boehringer, Mannheim) in 10 mmol/l Tris-HCl, 100 mmol/l NaCl, 5 mmol/l MgCl₂, 1 mmol/l 2-Mercaptoethanol, pH 8, bei 37°C eine Stunde inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Zugabe von 20 mmol/l EGTA und nach 10minütigem Erhitzen auf 65°C gestoppt. Der Vektor pZ1 wurde aus *E. coli* Stamm DH5 (DSM 4242) entsprechend wie das Plasmid pAD 20 isoliert. 0,1 µg des Vektors wurde mit 1 U des Restriktionsenzym *Bgl*III in 10 mmol/l Tris-HCl, 50 mmol/l NaCl, 10 mmol/l MgCl₂, 1 mmol/l Dithiothreitol, pH 7,5, bei 37°C 40 Minuten inkubiert. Dann wurden 5 U alkalische Phosphatase zugegeben und weitere 20 Minuten inkubiert. Die Reak-

tion wurde durch EGTA und Erhitzen gestoppt, wie zuvor für den Verdau von pAD 20 beschrieben. Beide Verdau wurden mit 500 µl einer mit 0,1 M Tris-HCl pH 8 gesättigten Phenollösung extrahiert und anschließend die wässrige Phase von der Phenolhaltigen Phase durch Zentrifugation getrennt. Der wässrige Überstand wurde anschließend mit 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1, v/v) extrahiert. Der resultierende wässrige Überstand wurde mit 0,25 Volumenteilen 2 M Lithiumchlorid und 2,5 Volumenteilen Ethanol versetzt und die dadurch präzipitierte DNA in 10 µl 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7,6 aufgenommen. Zur Ligation wurde 1 µl des pAD 20 Präzipitats und 1 µl des pZ1 Präzipitats zusammengegeben und 8 µl 2 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0,6 mM ATP pH 7,6 sowie 1 U T4 Ligase hinzugefügt. Die Mischung wurde bei 12°C 16 Stunden inkubiert.

Mit diesem Ligase-Reaktionsansatz wurde *E. coli* DH5, wie bei Hanahan beschrieben, transformiert (Hanahan: Techniques for DNA Transformation. In: DNA cloning ed. Glover, 1985, IRL Press, pp 109–135). Der Transformationsansatz wurde auf LB Medium plus 50 µg/ml Ampicillin ausplattiert und bei 37°C bebrütet. Aus einigen hochgewachsenen Transformanten wurde die Plasmid DNA isoliert.

Sie wurde mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und anschließend einer Agarosegel-Elektrophorese unterzogen. In Stamm DH5 pZ1–*asd* konnte das in Abbildung 1 dargestellte Plasmid gefunden werden.

Dieses Plasmid wurde über CsCl-Dichtegradientenzentrifugation präparativ aus *E. coli* DH5 pZ1–*asd*, wie bei Maniatis beschrieben, isoliert und mit 1 µg davon Protoplasten von *C. glutamicum* transformiert, wie in der DE-Patentanmeldung P 37 37 729.9 beschrieben.

Beispiel 2

Subklonierung des *dapA*-Gens aus *E. coli* in pZ1

Das *dapA*-Gen enthaltende Plasmid pDA3 wurde aus *E. coli* RDA8 (Richaud et al., 1986, J. Bacteriol. 166, 297–300) wie in Beispiel 1 angegeben isoliert. Dieses Plasmid wurde mit den Restriktionsenzymen *Pst*I und *Sma*I (Hersteller Boehringer, Mannheim) laut Herstellerangaben verdaut und die Reaktion wie in Beispiel 1 angegeben, gestoppt. Der Vektor pZ1 wurde durch *Pst*I und *Sca*I verdaut und mit alkalischer Phosphatase wie in Beispiel 1 beschrieben, behandelt. Beide Präparationen wurden extrahiert und ligiert wie in Beispiel 1 beschrieben. Mit dem Ligationansatz wurde *E. coli* DH5 transformiert und die gewünschten Transformanten auf Kanamycin-Resistenz und Ampicillin-Sensitivität selektiert. Transformanten wurden durch Restriktionsanalyse überprüft und das gewünschte Plasmid, so wie es in Abbildung 2 dargestellt ist, in dem Stamm DH5 pZ1–*dapA* nachgewiesen. Dieser die heterologe DNA enthaltende Vektor wurde nach *C. glutamicum* gebracht, wie in Beispiel 1 beschrieben.

Beispiel 3

Subklonierung des *dapA* und des *asd*-Gens aus *E. coli* in pZ1.

Der in Beispiel 2 angegebene und das *dapA*-Gen enthaltende Vektor pZ1–*dapA* wurde entsprechend den Angaben des Herstellers (Boehringer, Mannheim) mit dem Restriktionsenzym *Bgl*III verdaut und mit alkalischer Phosphatase wie in Beispiel 1 angegeben behan-

delt. Das asd-Gen enthaltende DNA-Fragment wurde aus dem Plasmid pAD 20 (Haziza et al, 1982, EMBO Journal, 379-394) isoliert, indem das Plasmid mit dem Restriktionsenzym BamHI verdaut wurde und die entstehenden Fragmente in einem 0,7%-igen Agarosegel, das 40 mM Tris und 1 mM EDTA enthielt, bei pH 8 für 1 Stunde bei 100 Volt aufgetrennt wurde. Das Fragment wurde durch Elektroelution wie bei Maniatis et al, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor 1982 beschrieben, gewonnen. Das Fragment wurde mit dem BamHI gespaltenen Plasmid pZ1-dapA durch 1 U T4 Ligase bei 12°C ligiert, wie in Beispiel 1 angegeben. Mit dem Ligase-Reaktionsansatz wurde E. coli DH5 wie in Beispiel 1 beschrieben, transformiert und Transformanten auf LB Medium plus 50 µg/ml Ampicillin gewonnen. Aus einigen Transformanten wurde die Plasmid DNA isoliert, mit verschiedenen Restriktionsenzymen verdaut und einer Agarosegel-Elektrophorese unterzogen. Der Stamm DH5 pZ1-asd-dapA enthielt das Plasmid sowie in Abbildung 3 angegeben. Dieses Plasmid wurde, wie in Beispiel 1 und 2 angegeben, nach C. glutamicum transformiert.

Beispiel 4

L-Lysinbildung mit C. glutamicum DG-52-5 pZ1-dapA

In einen 500 ml Erlenmeyerkolben mit 2 Schikanen wurden 60 ml einer Nährlösung mit folgender Zusammensetzung gegeben:

40 g/l Glucose \times H₂O
20 g/l (NH₂)₂SO₄
0,5 g/l K₂HPO₄
0,5 g/l KH₂PO₄
0,25 g/l MgSO₄ \times 7 H₂O
0,01 g/l FeSO₄ \times 7 H₂O
0,01 g/l MnSO₄ \times 4 H₂O
0,001 g/l ZnSO₄ \times 7 H₂O
0,0002 g/l CuSO₄
20 g/l CaCO₃

Glucose wurde getrennt sterilisiert, CaCO₃ trocken sterilisiert (8 Stunden bei 150°C) und beides der Nährlösung steril zugesetzt.

Die Fermentation wurde mit einer 16 Stunden alten Vorkultur von C. glutamicum DG 52-5 (AEC^R) angeimpft bzw. mit DG 52-5 pZ1-dapA, so daß die Anfangszellkonzentration einer optischen Dichte bei 600 nm von 0,5 bis 0,8 entsprach. Die Hauptkultur wurde bei 30°C und 140 rpm inkubiert.

Nach 72 Stunden wurden folgende Werte bestimmt:

Stamm: mM Lysin,
DG 52-5: 33,
DG 52-5 pZ1-dapA: 41.

Beispiel 5

L-Lysinbildung mit C. glutamicum DG 52-5 pZ1-asd
Es wurde wie in Beispiel 4 verfahren, jedoch wurde die Fermentation mit Stamm DG 52-5 pZ1-asd ausgeführt.

Nach 72 Stunden wurden folgende Werte bestimmt:

Stamm: mM Lysin,
DG 52-5: 33,
DG 52-5 pZ1-asd: 40.

Beispiel 6

L-Lysinbildung mit C. glutamicum DG 52-5 pZ1-asd-dapA

Es wurde wie in Beispiel 4 verfahren, jedoch wurde die Fermentation mit dem Stamm DG 52-5 pZ1-asd-dapA ausgeführt.

Nach 72 Stunden wurden folgende Werte bestimmt:

Stamm: mM Lysin,
DG 52-5: 33,
DG 52-5 pZ1-asd-dapA: 42.

Die folgenden Stämme sind bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen (DSMZ) in Braunschweig nach dem Budapest-Vertrag hinterlegt worden:

Corynebacterium glutamicum DG 52-5 pZ1-asd:
DSMZ 4421,
Corynebacterium glutamicum DG 52-5 pZ1-dapA:
DSMZ 4422,
Corynebacterium glutamicum DG 52-5 pZ1-asd-dapA:
DSMZ 4423.

Die sonstigen genannten E. coli-Stämme sind über das E. coli Genetic Stock Center der Yale-University, New Haven, USA, erhältlich und verfügbar.

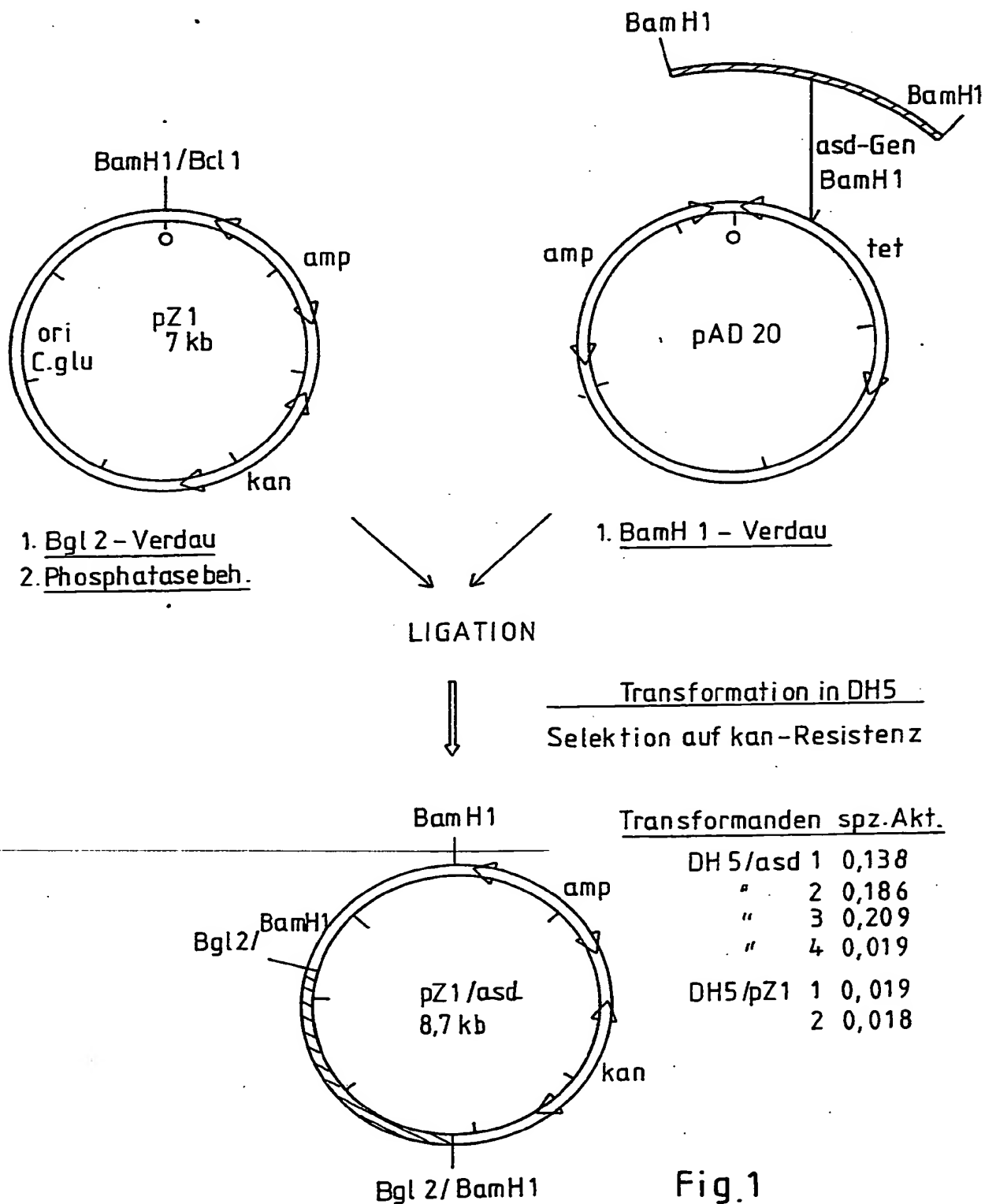
Patentansprüche

1. In Corynebacterium oder Brevibacterium replizierbare rekombinante DNA, bestehend aus Vektor-DNA und einem DNA-Fragment, das ein für Aspartatsemialdehyd-Dehydrogenase (asd) und/oder Dihydrodipicolinatsynthese (dapA) codierendes Gen enthält und aus einem Mikroorganismus der Gattung Escherichia, Serratia oder Klebsiella stammt.
2. Rekombinante DNA nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das asd-Gen und/oder das dapA-Gen aus Plasmiden gewonnen wird, die sich von Mikroorganismen der Gattungen Escherichia, Serratia oder Klebsiella ableiten.
3. Rekombinante DNA nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das asd-Gen vom Plasmid pAD 20 stammt.
4. Rekombinante DNA nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das dapA-Gen vom Plasmid pAD 3 stammt.
5. Rekombinante DNA nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Vektor-DNA durch den Vektor pZ1 gebildet wird.
6. Corynebacterium oder Brevibacterium, enthaltend replizierbare rekombinante DNA gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 5 und ein chromosomales Gen, das für L-Lysin codiert.
7. Verfahren zur Herstellung von L-Lysin durch Fermentation, dadurch gekennzeichnet, daß man Corynebacterium oder Brevibacterium in einem bekannten Medium kultiviert und das gebildete L-Lysin daraus gewinnt.
8. Corynebacterium glutamicum DSM 4421.
9. Corynebacterium glutamicum DSM 4422.
10. Corynebacterium glutamicum DSM 4423.

Hierzu 3 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

Subklonierung des ASA-Dehydrogenase-Gens



Subklonierung des DDP-Synthase-Gens (dapA)

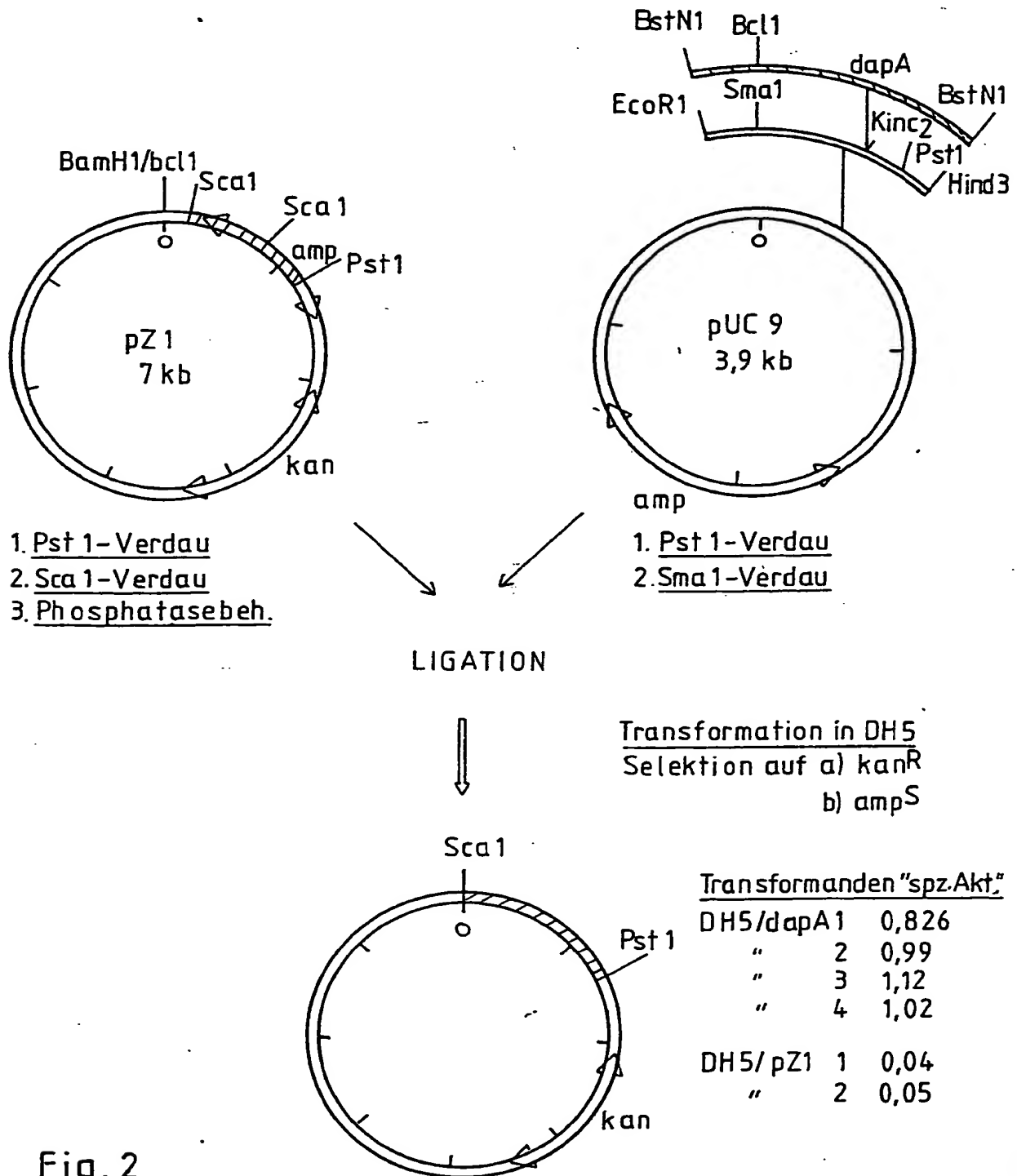


Fig. 2

Subklonierung des DDP-Synth. und ASA-Dehydrog. Gens

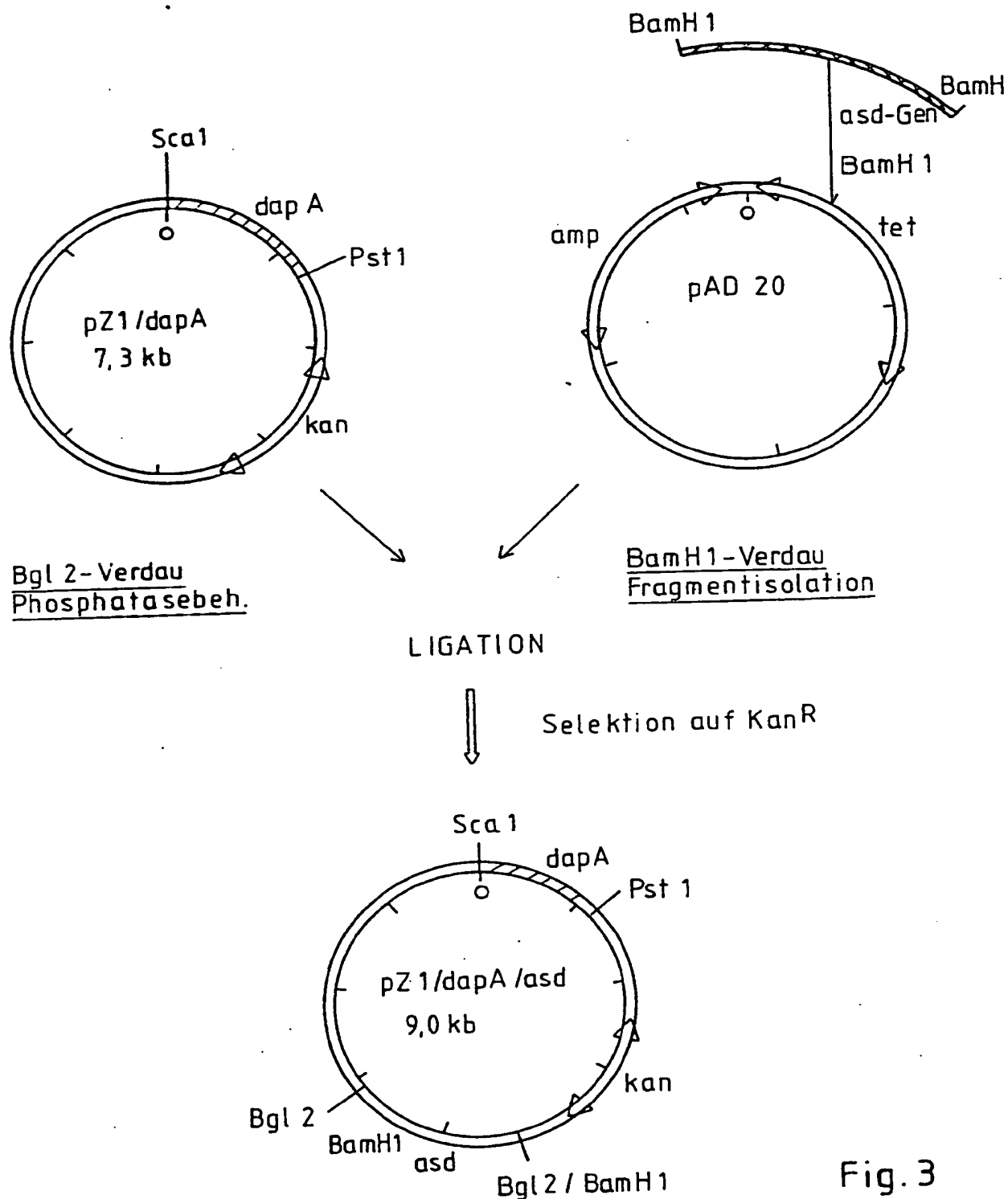


Fig. 3